

明細書

リガンド特異性の検定方法

技術分野

本発明は、固相担体を用いた分子間相互作用における基盤技術に関する。より詳しくは、解析を目的とする分子を固相担体に固定化し、当該固相担体上での分子間相互作用を利用し、当該相互作用を測定、解析することによって、解析を目的とする分子に特異的な相互作用を有する分子を選別、精製する、あるいは分子間の特異的な相互作用を解析する技術に関する。

背景技術

アフィニティー樹脂を用いたターゲットタンパク質探索研究において、アフィニティーに結合したタンパク質がリガンド特異的なものであるか、あるいは非特異的なものであるかを判定することは重要である。従来、この目的には材料となるタンパク質混合物に、非修飾の対象リガンドを予めあるいはアフィニティー樹脂と同時に加え、対象タンパク質量の減少あるいは消失を確認する、いわゆる拮抗実験が汎用されてきた。つまり、拮抗剤としてのリガンドが共存することによって、アフィニティー樹脂へのタンパク質の結合が阻害されることが、そのタンパク質がリガンドに特異的であると考えするのに必要な条件と考えられてきた。しかし、この方法を適用する場合、必要量のリガンドを対象タンパク質混合物に溶解させることが困難である場合が多く、現実的には実験が遂行できないという弊害があった。特に医薬品を対象とする場合、医薬品がある程度の脂溶性を有している場合が多いため（特に経口投与可能な医薬品は受動拡散による膜透過性を担保するためある程度以上の脂溶性の性質を有する）、充分なリガンド濃度を達成することが出来ず拮抗実験によるアフィニティー樹脂上に見出されたタンパク質に関する検討実験が断念されてきた経緯がある。具体的には、拮抗実験を行うためにはタンパク質が存在する水溶液に数百 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のリガンド（例えば TOYO PEARL $10 \mu\text{l} = 1 \mu\text{mol}$ を使用するとすれば、分子量 500 のリガンド（拮抗剤）の場合、薬剤を樹脂上のリガンドと等量共存させる場合でも $0.5 \text{mg}/\text{ml}$ 以上の溶解度が

必要)を溶解させる必要があるが、一般には、各種のイオンやタンパク質等の溶質
がかなりの量溶け込んでいる生体材料溶液にこのような高濃度のリガンドを溶解さ
せることは困難である。このことは医薬品に限らず、経口投与で興味ある薬理作用
を示す化合物、例えば環境物質、毒物等にも共通する問題であり、本制限は創薬タ
5 ーゲット探索研究全体の問題としてその解決が求められてきた。

また、従来方法では拮抗効果を明確にするために樹脂上のリガンド量以上のリガ
ンドを加える場合が多いが、その時にライセート (l y s a t e) 等の生体材料溶
液中に存在することになる数mg/ml という高濃度のリガンドの存在によるタン
パク質の変性も大きな問題であった。すなわち、アフィニティー実験により見出さ
10 れたアフィニティー樹脂結合タンパク質の特異性検定のために行う拮抗実験時にリ
ガンド添加によるバンドの消失が観察されても、それが拮抗作用によるものか、あ
るいはリガンドによる非特異的なタンパク質変性作用によるタンパク質の失活に由
来するものかの判別が困難になるのである。

従って、上記したような従来の拮抗実験で問題となっていた、1) 対象リガンド
15 の溶解度の問題、ならびに2) 添加する対象リガンドによるタンパク質の非特異的
な変性作用の問題を解決し得る、アフィニティー樹脂に結合するタンパク質のリガ
ンド特異性の検定方法が求められていた。

本発明は、アフィニティー樹脂に結合するタンパク質のリガンド特異性を検定す
る方法の提供を目的とし、特にリガンドの溶解度の問題ならびに添加する対象リガ
20 ンドによるタンパク質の非特異的な変性作用の問題が改善された、検定方法の提供
を目的とする。

発明の開示

本発明者らは、上記課題に鑑み、種々検討を行った結果、従来方法である拮抗実
験で実施されていた工程、「未修飾リガンドを直接タンパク質混合物に添加する工
25 程」に代えて「リガンドを固定化したアフィニティー樹脂で前処理する」工程を行
うことによって、従来法で問題とされていた1) 対象リガンドの溶解度の問題、
2) 添加する対象リガンドによるタンパク質の非特異的な変性作用の問題等を一度に

解決することができることを見出し、一連の検定方法を確立して本発明を完成するに至った。

試料、特に生体試料中には、特定のリガンドに特異的に結合するタンパク質以外に非特異的に結合、吸着するタンパク質が存在する。本発明はかかる状況下、リガンドに結合する種々のタンパク質について、そのリガンド特異性を検定する方法に関するものである。本発明は、リガンドに特異的に結合するタンパク質はその結合定数が高く、優先的にリガンド固定化固相担体に結合するという新たな知見に基づくものである。

即ち本発明は下記の通りである。

〔1〕リガンドと結合し得る分子の、そのリガンドとの結合が特異的であるか否かを検定する方法であって、以下の工程を含む方法；

（1）試料をリガンド固定化固相担体で処理し、処理液を得る一方で固相担体上に結合したタンパク質を抽出し、リガンド固定化固相担体抽出液 1 を得る工程、

（2）前工程で得られた処理液をリガンド固定化固相担体（前工程で用いたリガンド固定化固相担体と同種のリガンドを固定化してなる別の固相担体）で処理し、処理液を得る一方で固相担体上に結合したタンパク質を抽出し、リガンド固定化固相担体抽出液 2 を得る工程、

（3）リガンド固定化固相担体抽出液 1 に含まれるタンパク質とリガンド固定化固相担体抽出液 2 に含まれるタンパク質とを比較解析する工程、

（4）工程（3）で得られた解析結果をもとにリガンド固定化固相担体抽出液 1 で検出され、且つリガンド固定化固相担体抽出液 2 で検出されないかまたは検出されても、他のタンパク質に比較し、リガンド固定化固相担体抽出液 1 に対する減少が有意なタンパク質を同定し、当該タンパク質をリガンド特異的と判定する工程。

〔2〕工程（2）を 2 回以上繰り返すことを特徴とする、上記〔1〕記載の方法。

〔3〕リガンドと結合し得る分子の、そのリガンドとの結合が特異的であるか否かを検定する方法であって、以下の工程を含む方法；

(1) 試料を2分割し、その一方を不活性物質固定化固相担体で処理し、処理液を得る工程、

(2) 前工程で得られた、不活性物質固定化固相担体で処理した後の処理液をリガンド固定化固相担体（後述する工程（3）および工程（4）で用いるリガンド固定化固相担体と同種のリガンドを固定化してなる別の固相担体）で処理し、処理液を得る一方で固相担体上に結合したタンパク質を抽出し、リガンド固定化固相担体抽出液1を得る工程、

(3) 工程（1）で2分割した残りの一方の試料をリガンド固定化固相担体で処理し、処理液を得る工程、

(4) 前工程で得られた、リガンド固定化固相担体で処理した後の処理液をリガンド固定化固相担体（前工程（3）で用いたリガンド固定化固相担体と同種のリガンドを固定化してなる別の固相担体）で処理し、処理液を得る一方で固相担体上に結合したタンパク質を抽出し、リガンド固定化固相担体抽出液2を得る工程、

(5) リガンド固定化固相担体抽出液1に含まれるタンパク質とリガンド固定化固相担体抽出液2に含まれるタンパク質とを比較解析する工程、

(6) 工程（5）で得られた解析結果をもとにリガンド固定化固相担体抽出液1で検出され、且つリガンド固定化固相担体抽出液2で検出されないかまたは検出されても、他のタンパク質に比較し、リガンド固定化固相担体抽出液1に対する減少が有意なタンパク質を同定し、当該タンパク質をリガンド特異的と判定する工程。

〔4〕 不活性物質がステアリン酸である、上記〔3〕記載の方法。

〔5〕 不活性物質が、対象となる当該リガンドと構造的に類似し、且つ当該リガンドが有する生理活性は有さないものである、上記〔3〕記載の方法。

〔6〕 試料が生体試料である、上記〔1〕または〔3〕記載の方法。

〔7〕 さらに、比較解析によって、試料中のタンパク質のリガンドへの結合定数を算出する工程を含む上記〔1〕または〔3〕記載の方法。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の一実施態様を模式的に示す図である。

図 2 は、本発明の一実施態様を模式的に示す図である。

図 3 は、リガンドと結合し得る分子の、そのリガンドの結合が特異的であることを示す図である（リガンド：FK506）。図中 A～E は任意に選択した、FK506 に特異的ではないと予想されるタンパク質の結果である。

5

発明の詳細な説明

本発明の一実施態様を模式的に図 1 に表す（実施態様 1）。

（1）試料をリガンド固定化固相担体で処理し、処理液を得る一方で固相担体上に結合したタンパク質を抽出し、リガンド固定化固相担体抽出液 1 を得る工程。

本工程において用いる試料は、対象となるリガンドに特異的に結合する物質を含み得るものであって、複数の物質を含む。全て公知化合物から構成されるものであっても、一部新規な化合物を含むものであっても、さらには全て新規な化合物から構成されるものであってもよい。全て公知な化合物から構成される試料としては、大腸菌等によって遺伝子工学的に調製された精製タンパク質の混合物等であり、一部新規な化合物を含むものとしては血液、血漿、血清、尿、細胞や組織の抽出液あるいは溶解液（l y s a t e）等の生体試料であり、また全て新規な化合物から構成されるものとしては、まだその機能や構造が知られていない新規なタンパク質や新しく合成された化合物等の混合物が挙げられる。試料が混合物の場合、特に公知化合物を含む場合には、任意にこれらの化合物の試料中の含有量を所望の値に設定しておくこともできるが、特に決める必要はない。

含められる物質としては、タンパク質、核酸、糖質、脂質等種々の物質が挙げられる。当該タンパク質には単純タンパク質に加え、糖タンパク質やリポタンパク質等の複合タンパク質が包含される。

試料の由来や性状、後述の固相担体との処理方法等によっても異なるが、必要に応じて試料は適当な緩衝液で希釈して用いることができる。緩衝液としては、リガンドとターゲット分子との特異的な相互作用に不都合な影響を与えないものであれば特に限定されないが、例えば生理食塩水、リン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液等が挙げられ、所望により安定剤や防腐剤等を添加して用いてもよい。

本発明において固相担体に固定化するリガンドは特に限定されず、公知の化合物であっても今後開発される新規な化合物であってもよい。また、低分子化合物であっても高分子化合物であってもかまわない。ここで低分子化合物とは分子量1000未満程度の化合物であって、例えば医薬品として通常使用し得る有機化合物およびその誘導体や無機化合物が挙げられ、有機合成法等を駆使して製造される化合物やその誘導体、天然由来の化合物やその誘導体、プロモーター等の小さな核酸分子や各種の金属等であり、望ましくは医薬品として使用し得る有機化合物およびその誘導体、核酸分子をいう。また、高分子化合物としては分子量1000以上程度の化合物であって、タンパク質、ポリ核酸類、多糖類、およびこれらを組み合わせたものなどが挙げられ、望ましくはタンパク質である。これらの低分子化合物あるいは高分子化合物は、公知のものであれば商業的に入手可能であるか、各報告文献に従って採取、製造、精製等の工程を経て得ることができる。これらは、天然由来であっても、また遺伝子工学的に調製されるものであってもよく、また半合成等によっても得ることができる。

リガンドの固相担体への固定化は通常当分野で実施されている方法に準じて行うことができる。簡便且つ確実な手段としてアミド結合形成反応を利用する方法が挙げられる。本反応は、例えば「ペプチド合成の基礎と実験」(ISBN 4-621-02962-2、丸善、昭和60年初版)に従って実施できる。各反応に用いられる試薬や溶媒については当分野で通常用いられるものが利用でき、採用する結合反応によって適宜選択される。

本発明において用いられる固相担体は、その上でリガンドとターゲット分子との特異的な相互作用が生じるものであれば特に限定されず、当分野で通常使用されるものが利用でき、試料との処理やリガンド固定化固相担体抽出液を調製する為に行われる方法に応じて適宜決定される。材質としては、例えば、樹脂(ポリスチレン、メタクリレート系樹脂、ポリアクリルアミド等)、ガラス、金属(金、銀、鉄、シリコン等)等が用いられる。これらの固相は、いかなる形状のものであってもよく、また上記した材質の種類や、試料との処理やリガンド固定化固相担体抽出液を調製

する為に行われる方法に応じて適宜決定される。例えば板状、ビーズ状、薄膜状、糸状、コイル状等が挙げられる。

試料のリガンド固定化固相担体での処理は、簡便には、リガンド固定化固相担体と試料を混合することによって実施される。例えばビーズ状のリガンド固定化固相担体を試料（好ましくは液状）と4℃～室温で30分～一晩、ゆるやかに撹拌しながら混合する。試料が液状でない場合には、上記したように適当な緩衝液等で溶解し予め液状としておくのが好ましい。処理後、リガンド固定化固相担体と試料とを分離する。かかる分離する手段もリガンド固定化固相担体の形状や材質等によって適宜設定されるが、例えばビーズ状の固相担体を用いる場合には、遠心分離操作や濾過による分離が好適である。遠心分離操作の各条件は、通常当分野で実施される各条件が採用される。具体的には4℃～室温で、100～15000g、1秒から10分間の遠心分離操作や固相担体が通過しないメッシュの膜を用いた濾過操作が例示される。これらの操作により得られる上澄み液あるいは濾液等を処理液と称する。

上記したように処理液を得る一方で、遠心分離操作あるいは濾過操作により得られる沈殿あるいは残渣、すなわちリガンド固定化固相担体から、当該固相担体上に結合したタンパク質を抽出し、リガンド固定化固相担体抽出液を得る。試料を最初にリガンド固定化固相担体で処理して得られるリガンド固定化固相担体抽出液を便宜上「リガンド固定化固相担体抽出液1」と称する。

リガンド固定化固相担体上に結合したタンパク質を抽出する方法は、当分野で通常行われている種々の方法が利用できるが、例えば、リガンド固定化固相担体を界面活性剤を含有する抽出液で処理することによって行う。界面活性剤としてはドデシル硫酸ナトリウム（SDS）や、ポリオキシエチレン ソルビタン モノラウレート（例えば、商品名：Tween 20）、ポリオキシエチレン（9）オクチルフェニル エーテル（例えば、商品名NP-40）等が挙げられる。後述するが、タンパク質の検出にSDS-PAGEを用いる場合には、SDSを含有するSDS-PAGE用サンプルバッファーで直接タンパク質を抽出することが好適である。

(2) 前工程 (工程 (1)) で得られた処理液をリガンド固定化固相担体で処理し、処理液を得る一方で固相担体上に結合したタンパク質を抽出し、リガンド固定化固相担体抽出液 2 を得る工程。

本工程で用いるリガンド固定化固相担体は、前工程 (工程 (1)) で用いたリガンド固定化固相担体と同種のリガンドを固定化してなる別の固相担体である。

処理液のリガンド固定化固相担体での処理は、工程 (1) で実施した試料のリガンド固定化固相担体での処理と同様にして行うが、簡便には、リガンド固定化固相担体と処理液を混合することによって実施される。例えばビーズ状のリガンド固定化固相担体を処理液と 4℃～室温で 30 分～一晩、ゆるやかに攪拌しながら混合する。処理後、リガンド固定化固相担体と処理液とを分離する。かかる分離する手段もリガンド固定化固相担体の形状や材質等によって適宜設定されるが、例えばビーズ状の固相担体を用いる場合には、遠心分離操作や濾過による分離が好適である。遠心分離操作の各条件は、通常当分野で実施される各条件が採用される。具体的には 4℃～室温で、100～15000 g、1 秒から 10 分間の遠心分離操作や固相担体が通過しないメッシュの膜を用いた濾過操作が例示される。

遠心分離操作あるいは濾過操作により得られる沈殿あるいは残渣、すなわちリガンド固定化固相担体から、当該固相担体上に結合したタンパク質を抽出し、リガンド固定化固相担体抽出液を得る。処理液をリガンド固定化固相担体で処理して得られるリガンド固定化固相担体抽出液を便宜上「リガンド固定化固相担体抽出液 2」と称する。本工程を 2 回以上繰り返した場合には、その回数に応じて複数のリガンド固定化固相担体抽出液 2 が得られる、そのような場合には混同を避けるため、リガンド固定化固相担体抽出液 2 a、2 b、2 c・・・等と区別してもよい。

本工程でリガンド固定化固相担体上に結合したタンパク質を抽出する方法も前工程 (工程 (1)) で実施した方法と同様なものが用いられる。

(3) リガンド固定化固相担体抽出液 1 に含まれるタンパク質とリガンド固定化固相担体抽出液 2 に含まれるタンパク質とを比較解析する工程。

本工程は、通常のタンパク質の解析方法が利用できる。例えばSDS-PAGEによる解析が簡便である。リガンド固定化固相担体抽出液1とリガンド固定化固相担体抽出液2を同一条件下でSDS-PAGEに付し、得られる電気泳動のパターンを比較することによって各抽出液中のタンパク質の相違を調べることができる。

5 (4) 工程(3)で得られた解析結果をもとにリガンド固定化固相担体抽出液1で検出され、且つリガンド固定化固相担体抽出液2で検出されないかまたは検出されても、他のタンパク質に比較し、リガンド固定化固相担体抽出液1に対する減少が有意なタンパク質を同定し、当該タンパク質をリガンド特異的と判定する工程。

かかる工程は、特異性の高いタンパク質ほど(高い結合定数を有するタンパク質)、1回目のリガンド固定化固相担体処理で試料中(あるいは処理液中)から消失する割合が高くなるという本願発明で得られた知見に基づいている。「他のタンパク質に比較し、リガンド固定化固相担体抽出液1に対する減少が有意である」ことは肉眼で判定可能であり、また、通常当分野で実施されている統計学的処理(例えば、全体のタンパク質の変化と特定のタンパク質の減少率を比較する)によって
10 判断してもよい。

さらに、本発明の別の一実施態様を図2に示す。本実施態様は、不活性物質が固定化された固相担体で処理する工程を含む。以下に本実施態様について説明する(実施態様2)。

(1) 試料を2分割し、その一方を不活性物質固定化固相担体で処理し、処理液を得る工程。
20

本工程において用いる試料は、上記したものと同様なものである。試料はあらかじめ2分割し、その一方を本工程に使用し、残る一方を後述の工程(3)で用いる。工程(5)で比較解析を行う為には、工程(1)および工程(3)の出発原料となる試料は同一のもの(即ち同一の組成を有する)である必要があり、従ってあらかじめ2分割しておくことが好ましい。リガンド特異的な分子がリガンド固定化固相担体上に結合することができれば、当該試料は等しく2分割してもよいし、互いに異なる量で2分割してもよい。
25

本発明において固相担体に固定化される不活性物質とは、例えばターゲット分子を探索する目的となるリガンド以外の物質であり、当該リガンドが有する生理活性を有さない物質である。非特異的なタンパク吸着に関してほぼ同様な挙動を示すことが期待されることから、特徴的な官能基や母核が当該リガンドと類似している物質であることがより好ましい。例えばターゲット分子の探索を目的とするリガンドが、抗炎症作用を有する物質であれば、不活性物質とは抗炎症作用を有さない物質であり、好ましくは構造が類似し物理化学的性質が類似している物質である。当該リガンドの構造活性相関の情報が予め入手でき利用し得る場合には、その情報に応じて適宜不活性物質を選択し固定化固相担体を調製することができる。一方、予めそのような情報がない場合には、通常、非特異的なタンパク質吸着を生じることが予測される疎水性物質を固定化してもよい。疎水性物質としては例えばステアリン酸等が例示される。疎水性の程度は、一般的に疎水性パラメーターによって表すことができるが、本発明においては「疎水性物質」の疎水性は、分配係数、具体的にはLOGPによって規定することができる。LOGPの算出には、簡便には、CLOGP（化合物の疎水性パラメーターを計算機によって見積もるソフトによって得られる予測値；例えばCorwin/Leo's program (CLOGP, Daylight Chemical Information System Co., Ltd) を使用して計算できる）等が利用されるが、疎水性のパラメーターはCLOGPに限定されるものではない。CLOGPが大きい程、疎水性が高いことを意味する。非特異的物質の除去という目的の達成に鑑みると、本発明の疎水性物質のLOGPは、CLOGPとして算出した場合4以上、好ましくは6以上である。4未満では十分な非特異的物質の除去効果が得られない。また、LOGPが大きい程疎水性が高く、かかる高い疎水性を有する物質は好適に本発明の目的を達成し得るが、CLOGPとして算出した場合20程度を超えてもその効果に顕著な上昇が見られず、また合成の容易性という観点から通常CLOGPは20以下である。また、問題となるのは固相担体上での疎水的相互作用に基づく非特異的相互

作用であるから、「疎水性物質」の疎水性の程度は、より厳密には固相担体に固定化された状態、すなわち疎水性物質固定化固相担体全体の疎水性として定義されてもよい。

本発明において使用し得る疎水性物質としては、上記の性質を有するものであれば特に限定されないが、例えば上記の性質（即ちLOGPがCLOGPとして算出された場合、4以上、好ましくは6以上）を有するものである。より具体的には疎水性物質は、ウンデカン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、リノール酸、アラキドン酸、リノレン酸、オレイン酸、ステアリン酸、9-（ナフタレン-1-イル）-ノナン酸、ドデカンスルホン酸、オクタデカンスルホン酸およびヘキサデカンスルホン酸からなる群より選択される少なくとも1種であり、好ましくは、ミリスチン酸、パルミチン酸、リノール酸、アラキドン酸、リノレン酸、オレイン酸、ステアリン酸、オクタデカンスルホン酸およびヘキサデカンスルホン酸からなる群より選択される少なくとも1種であり、特に好ましくはステアリン酸またはオクタデカンスルホン酸である。

上記「疎水性物質」は、公知の物質であれば、商業的に入手可能か、あるいは各種文献に準じて調製することができる。また、新規な物質についても、当分野で通常実施される有機合成における各種の反応を利用することによって適宜調製することが可能である。

本発明において用いられる「不活性物質」についても、公知の物質であれば、商業的に入手可能か、あるいは各種文献に準じて調製することができる。また、新規な物質についても、当分野で通常実施される有機合成における各種の反応を利用することによって適宜調製することが可能である。新規な物質の場合には予め、目的とする生理活性を有していないこと、好ましくは試験対象となるリガンドと構造的に類似し、物理化学的性質が類似していることを確認する。

疎水性物質等の「不活性物質」を固定化する固相担体は、当分野で通常使用されるものが好適に使用できる。材質としては、例えば、樹脂（ポリスチレン、メタクリレート系樹脂、ポリアクリルアミド等）、ガラス、金属（金、銀、鉄、シリコン

等)等が用いられる。これらの固相担体は、いかなる形状のものであってもよく、また上記した材質の種類や、その後に実施する分子間の特異的な相互作用の解析の為にされる方法に応じて適宜決定される。例えば板状、ビーズ状、薄膜状、糸状、コイル状等が挙げられるが、樹脂からなるビーズであればカラムに充填することによりその後の操作を簡便にし、また金属の薄膜やガラスプレートもまた好適である。

固相担体への不活性物質の固定化は、通常当分野で実施される公知の方法およびそれらを適宜組み合わせた方法によって実施され、例えばアミド結合や、シッフ塩基形成、C-C結合、エステル結合、水素結合、疎水相互作用等の共有結合あるいは非共有結合による固定化が挙げられる。いずれも当分野で公知の材料ならびに反応により実施される。個々の結合は、通常当分野で実施される反応を利用して実施される。簡便且つ確実な手段としてアミド結合形成反応を利用する方法が挙げられる。本反応は、例えば「ペプチド合成の基礎と実験」(ISBN 4-621-02962-2、丸善、昭和60年初版)に従って実施できる。各反応に用いられる試薬や溶媒については当分野で通常用いられるものが利用でき、採用する結合反応によって適宜選択される。疎水性物質が固相担体に固定化されたか否かは、例えば反応前後の固相担体表面上のアミノ基の定量(例えばニンヒドリン試験)によって測定される反応率から確認することができる。

試料の不活性物質固定化固相担体での処理は、簡便には、不活性物質固定化固相担体と試料を混合することによって実施される。例えばビーズ状の不活性物質固定化固相担体を試料(好ましくは液状)と4℃～室温で30分～一晩、ゆるやかに攪拌しながら混合する。試料が液状でない場合には、上記したように適当な緩衝液等で溶解し予め液状としておくのが好ましい。処理後、不活性物質固定化固相担体と試料とを分離する。かかる分離する手段も不活性物質固定化固相担体の形状や材質等によって適宜設定されるが、例えばビーズ状の固相担体を用いる場合には、遠心分離操作や濾過による分離が好適である。遠心分離操作の各条件は、通常当分野で実施される各条件が採用される。具体的には4℃～室温で、100～15000g、1秒から10分間の遠心分離操作や固相担体が通過しないメッシュの膜を用いた濾

過操作が例示される。これらの処理により得られる上澄み液あるいは濾液を処理液と称する。尚、上記処理の方法ならびにその手順は上記したようにして適宜行うことができるが、好ましくは後述するリガンド固定化固相担体と試料（あるいは処理液）との処理と同様な条件下、同様な方法ならびに手順で実施することが、比較の上でも好ましい。

(2) 前工程（工程（1））で得られた、不活性物質固定化固相担体で処理した後の処理液をリガンド固定化固相担体で処理し、処理液を得る一方で固相担体上に結合したタンパク質を抽出し、リガンド固定化固相担体抽出液 1 を得る工程。

本工程で用いるリガンド固定化固相担体は、後述する工程（工程（3）および工程（4））で用いるリガンド固定化固相担体と同種のリガンドを固定化してなる別の固相担体である。

処理液のリガンド固定化固相担体での処理は、工程（1）で実施した、試料の不活性物質固定化固相担体での処理と同様にして行うことができる。処理後、固相担体上に結合したタンパク質を抽出し、リガンド固定化固相担体抽出液 1 を得る。かかる操作も実施態様 1 で詳述したのと同様な条件、手順で行うことができる。

(3) 試料をリガンド固定化固相担体で処理、処理液を得る工程。

本工程において用いる試料は、上記工程（1）で 2 分割して残ったもう一方の試料である。

本工程において用いるリガンド固定化固相担体は、工程（2）で用いたリガンド固定化固相担体と同種のリガンドを固定化してなる別の固相担体であり、実施態様 1 において詳述した「リガンド固定化固相担体」と同様にして調製することができる。また、試料のリガンド固定化固相担体での処理ならびに処理液の回収も、上記実施態様 1 で実施した処理と同様にして行うことができる。

(4) 前工程（工程（3））で得られた、リガンド固定化固相担体で処理した後の処理液をリガンド固定化固相担体（前工程（3）で用いたリガンド固定化固相担体と同種のリガンドを固定化してなる別の固相担体）で処理し、処理液を得る一方で

固相担体に結合したタンパク質を抽出し、リガンド固定化固相担体抽出液 2 を得る工程。

処理液のリガンド固定化固相担体での処理、処理液の回収ならびに固相担体に結合したタンパク質を抽出しリガンド固定化固相担体抽出液 2 を得るといった一連の各操作は、上記実施態様 1 に準じて実施する。

(5) リガンド固定化固相担体抽出液 1 に含まれるタンパク質とリガンド固定化固相担体抽出液 2 に含まれるタンパク質とを比較解析する工程。

本工程は、通常のタンパク質の解析方法が利用できる。例えば SDS-PAGE による解析が簡便である。リガンド固定化固相担体抽出液 1 とリガンド固定化固相担体抽出液 2 を同一条件下で SDS-PAGE に付し、得られる電気泳動のパターンを比較することによって各抽出液中のタンパク質の相違を調べることができる。

(6) 工程 (5) で得られた解析結果をもとにリガンド固定化固相担体抽出液 1 で検出され、且つリガンド固定化固相担体抽出液 2 で検出されないかまたは検出されても他のタンパク質に比較し、リガンド固定化固相担体抽出液 1 に対する減少が有意なタンパク質を同定し、当該タンパク質をリガンド特異的と判定する工程。

かかる工程は、実施態様 1 同様、特異性の高いタンパク質ほど（高い結合定数を有するタンパク質）、1 回目のリガンド固定化固相担体処理で試料中（あるいは処理液中）から消失する割合が高くなるという本願発明で得られた知見に基づいている。すなわち、先に不活性物質固定化固相担体であらかじめ処理しても、試料中からリガンド特異的タンパク質が消失することはなく、むしろ試料中に存在するリガンド特異的タンパク質の割合が増加する（不活性物質固定化固相担体での処理により試料中の非特異的タンパク質が除去される）。一方、不活性物質固定化固相担体での前処理を行なわない場合、実施態様 1 から明らかなように、1 回目のリガンド固定化固相担体処理で試料中からリガンド特異的タンパク質が消失する（すなわち、該処理に用いた固定化固相担体にリガンド特異的タンパク質が結合し、したがって 1 回目のリガンド固定化固相担体処理後に得られるリガンド固定化固相担体抽出液にリガンド特異的タンパク質が高濃度で含まれることになる）。

「他のタンパク質に比較し、リガンド固定化固相担体抽出液 1 に対する減少が有意である」ことは肉眼で判定可能であり、また、通常当分野で実施されている統計学的処理（例えば、全体のタンパク質量の変化と特定のタンパク質量の減少率を比較する）によって判断してもよい。

- 5 本発明の方法を用いて、あるタンパク質がリガンド特異的であるか否かを判定する場合、より定量的に判定を行いたい場合は、当該タンパク質のリガンドへの結合定数を算出する工程を、上記一連の工程に含めてもよい。

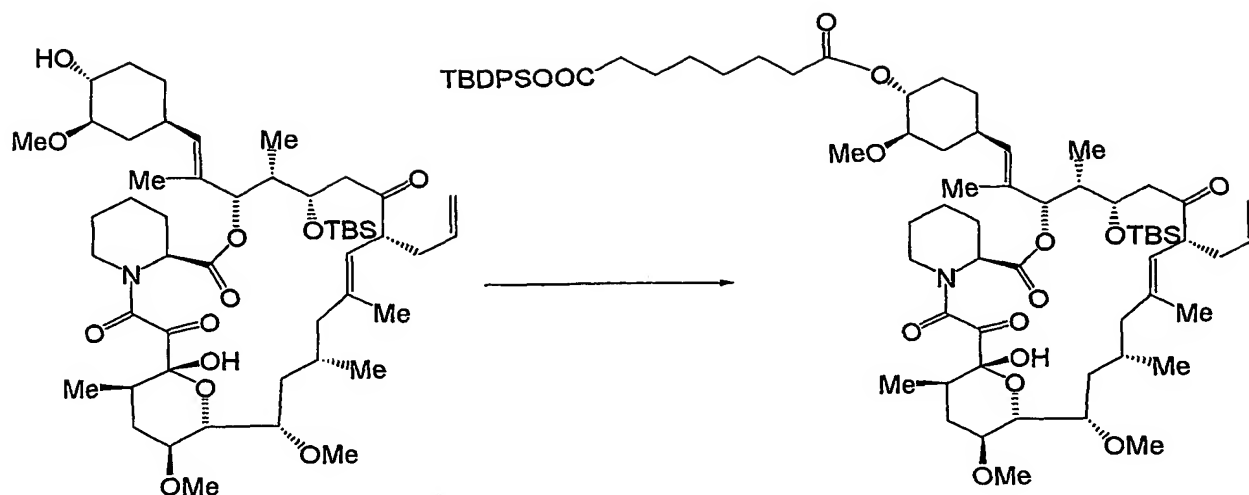
結合定数を算出する方法としては、当分野で通常行われている方法が利用でき、例えばラベル化されたリガンドを用いた E L I S A 実験や B I A C O R E (Wh i
10 t e s i d e らによる A n a l y t i c a l C h e m i s t r y (1999),
71, 777-790 等を参照) 等を用いた実験等の方法が挙げられる。

実施例

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。また、用いる各化合物や試薬等は特に言及
15 しない限り、商業的に入手可能であるか、また既知の報告等に基づいて調製することが
ことができる。

リガンド固定化固相担体の作成

製造例 1 : 17-アリル-14-(tert-ブチルジメチルシラニルオキシ)-1-ヒドロキシ-12-{2-[4-(7-(tert-ブチルジメチル
20 -シラニルオキシカルボニル)ヘプタノイルオキシ)-3-メトキシシクロ
ヘキシル]-1-メチルビニル}-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21,
27-テトラメチル-11, 28-ジオキサ-4-アザトリシクロ[22. 3.
1. 0^{4, 9}]オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオンの合成

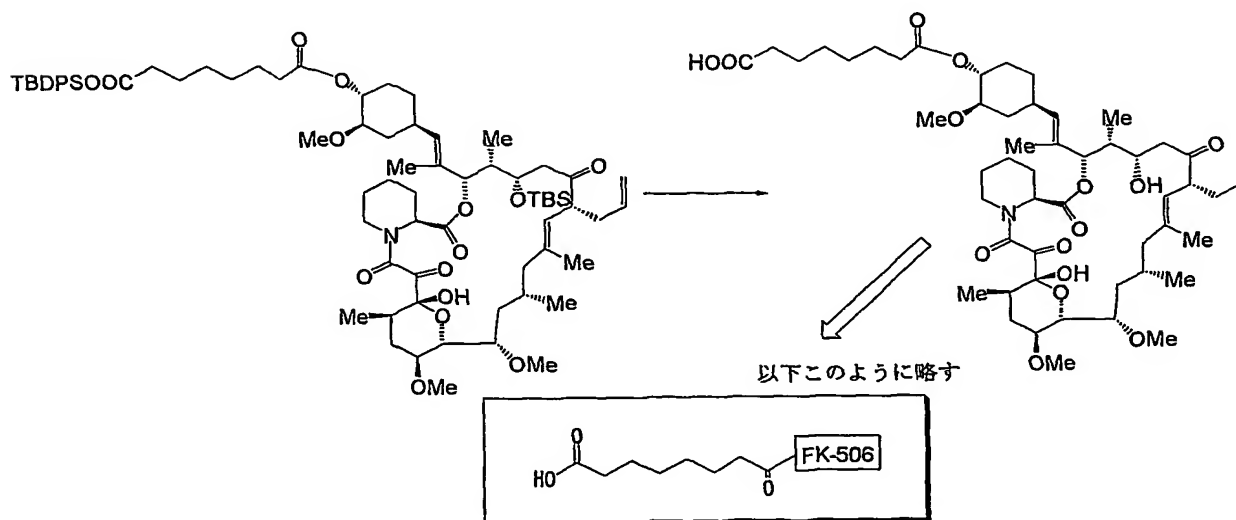


10 17-アリル-14-(tert-ブチル-ジメチル-シラニルオキシ)-1-
 ヒドロキシ-12-[2-(4-ヒドロキシ-3-メトキシ-シクロヘキシル)-
 1-メチル-ビニル]-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラ
 メチル-11, 28-ジオキサ-4-アザトリシクロ[22.3.1.
 0^{4,9}]オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオン (FK50
 15 6; 138mg, 0.15mmol)、O-モノ(tert-ブチル-ジメチル-
 シラニル)オクタン二酸(86.7mg, 0.218mmol)、ジメチルアミノ
 ピリジン(DMAP; 16.5mg, 0.098mmol)、1-[3-(ジメチ
 ルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(EDC/HCl; 69.
 1mg, 0.261mmol)および塩化メチレン(CH₂Cl₂; 1ml)の混合
 20 物を室温で1.5時間攪拌した。反応物を酢酸エチル-水混合液に注ぎ、抽出した。
 得られた有機相を水、食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウム(MgSO₄)で乾燥し
 た。MgSO₄を濾別後、減圧下濃縮した。こうして得られた残渣をシリカゲルカ
 ラムで精製し(20%AcOEt(n-ヘキサン中)で溶出)、目的とする17-
 25 アリル-14-(tert-ブチル-ジメチル-シラニルオキシ)-1-ヒドロキ
 シ-12-{2-[4-(7-(tert-ブチル-ジメチル-シラニルオキシ-
 カルボニル)ヘプタノイル-オキシ)-3-メトキシ-シクロヘキシル]-1-メ
 チル-ビニル}-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチ

ルー 11, 28-ジオキサー-4-アザートリシクロ [22. 3. 1. 0^{4, 9}] オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオン (44 mg, 24. 6%) を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: -0. 1-0. 1 (12H, m), 0. 7-2. 6 (47H, m), 0. 85 and 0. 86 (18H, s), 1. 50 (3H, s), 1. 63 (3H, s), 2. 75 (1H, m), 3. 31 (3H, s), 3. 35 (3H, s), 3. 39 (3H, s), 4. 05 (1H, m), 3. 0-4. 4 (6H), 4. 5-5. 8 (9H, m).

製造例 2: 17-アリル-1, 14-ジーヒドロキシ-12-{2-[4-(7-カルボキシ-ヘプタノイル-オキシ)-3-メトキシ-シクロヘキシル]-1-メチル-ビニル}-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチル-11, 28-ジオキサー-4-アザートリシクロ [22. 3. 1. 0^{4, 9}] オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオンの合成



製造例 1 で調製した 17-アリル-14-(tert-ブチル-ジメチル-シラニルオキシ)-1-ヒドロキシ-12-{2-[4-(7-(tert-ブチル-ジメチル-シラニルオキシ-カルボニル)-ヘプタノイル-オキシ)-3-メトキシ

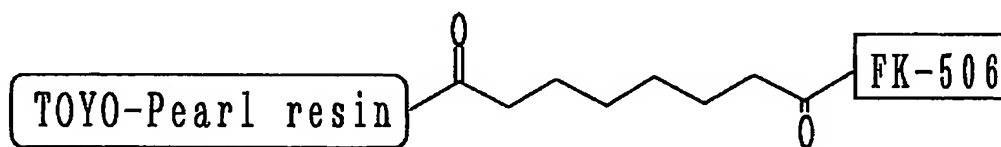
ーシクロヘキシル]ー1ーメチルービニル}ー23, 25ージメトキシー13, 19, 21, 27ーテトラメチルー11, 28ージオキサー4ーアザートリシクロ [22. 3. 1. 0^{4, 9}] オクタコスー18ーエンー2, 3, 10, 16ーテトラオン (44mg, 0.037mmol) とアセトニトリル (0.88ml) の混合物に46ー48%のフッ化水素 (HF) 水 (0.12ml) を静かに加え室温にて終夜攪拌した。反応物を酢酸エチルー水混合液に注ぎ、抽出した。得られた有機相を水、食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウム (MgSO₄) で乾燥した。MgSO₄を濾別後、減圧下濃縮した。こうして得られた残渣をシリカゲルカラムで精製し

(5%メタノール (クロロホルム中))、目的とする17ーアリルー1, 14ージーヒドロキシー12ー{2ー[4ー(7ーカルボキシーヘプタノイルーオキシ)ー3ーメトキシーシクロヘキシル]ー1ーメチルービニル}ー23, 25ージメトキシー13, 19, 21, 27ーテトラメチルー11, 28ージオキサー4ーアザートリシクロ [22. 3. 1. 0^{4, 9}] オクタコスー18ーエンー2, 3, 10, 16ーテトラオン (14.2mg, 40%) を得た。

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 0.7ー2.6 (47H, m), 1.50 (3H, s), 1.63 (3H, s), 2.75 (1H, m), 3.31 (3H, s), 3.35 (3H, s), 3.39 (3H, s), 4.05 (1H, m), 3.0ー4.4 (6H), 4.5ー5.8 (11H, m).

MS (m/z): 960 (M⁺)

製造例3: FK506結合TOYOパール樹脂 (TOYO-Pearl resin; TSK gel AF-amino) の合成

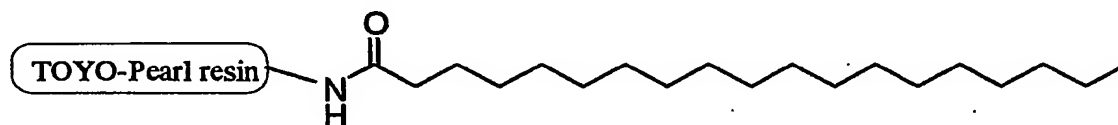


製造例2で調製した17ーアリルー1, 14ージーヒドロキシー12ー{2ー[4ー(7ーカルボキシーヘプタノイルーオキシ)ー3ーメトキシーシクロヘキシル

ル] -1-メチルービニル} -23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチルー11, 28-ジオキサ-4-アザートリシクロ [22. 3. 1. 0^{4, 9}] オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオン (38. 4mg, 0. 04mmol)、TOYOパール樹脂 (TSK gel AF-amino, 100 μ l, 遊離アミノ基 (available amino group) は0. 01mmol; 東ソー株式会社製)、EDC/HCl (9. 2mg, 0. 048mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt; 6. 5mg, 0. 048mmol) およびジメチルホルムアミド (DMF; 1ml) の混合物を室温で6時間攪拌した。反応の終点はニンヒドリン反応で残存アミノ基が肉眼で観測できなくなることで確認した。この時の反応率を換算すると約24%であった (推定リガンド濃度=24 μ mol/ml)。反応終了確認後、DMFで樹脂を5回洗浄した。ここに無水酢酸 (100 μ l) およびDMF (400 μ l) を加え1時間室温で攪拌した。その後DMFで十分洗浄し、得られたFK506結合TOYOパール樹脂は後述する結合実験に用いた。

疎水性物質固定化固相担体の作成

製造例4：ステアリン酸固定化樹脂 [TOYO+ステアリン酸] の合成



TOYOパール樹脂 (TSK gel AF-amino) にステアリン酸を固定化した。TOYOパール樹脂100 μ lに、DMF (0. 25ml) とジクロロメタン (0. 25ml) の混合溶媒に溶解したステアリン酸 (11. 38mg, 0. 04mmol) を加え、更にベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリス-ピロリジノーホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート (PyBOP; 26mg, 0. 05mmol)、及びN, N-ジイソプロピルエチルアミン (17 μ l, 0. 10mmol) を加え、室温で4時間振とうした。反応終了後、樹脂をDMFで十分に洗浄した後、ニンヒドリンテストにより縮合収率を測定した (約91%)。

実施例 1

(1-1) l y s a t e の調製

ラットの脳 (2.2 g) を混合液 A (0.25 M シュクロース, 25 mM T r i s バッファー (pH 7.4), 22 ml) に混ぜ、ホモジネートを作成後、95
5 000 r p m で 10 分間遠心分離した。遠心分離上清を取り、50000 r p m でさ
らに 30 分間遠心分離した。こうして得られた上清を l y s a t e として使用した。
なお、実験はすべて 4℃あるいは氷上で行った。

(1-2) 結合実験 (本願発明)

製造例 3 で合成した F K 5 0 6 を結合したアフィニティー樹脂および製造例 4 で
10 作成したステアリン酸固定化樹脂を用いて以下の手順で l y s a t e との結合実験
を行った。なお、l y s a t e は混合液 A で 1/2 に希釈して使用した。

各樹脂 (10 μ l) と l y s a t e (1 ml) を 4℃で約 1 時間、静かに振とう
した。その後、遠心分離操作を行い、夫々の上澄みを注意深く採集した。そして、
各上澄み液を再びフレッシュな F K 5 0 6 結合樹脂 (10 μ l) と混合した。約 3
15 時間静かに攪拌した後に、遠心分離操作を行い、上澄み液を除去した。得られた F
K 5 0 6 結合樹脂を混合液 A にて 5 回程度丁寧に洗浄し、樹脂上に結合するタンパ
グ質以外を出来る限り除いた。

こうして得られた各 F K 5 0 6 結合樹脂に 25 μ l の SDS 用 l o a d i n g
b u f f e r (n a k a l a i c a t . N O = 3 0 5 6 6 - 2 2、電気泳動用 s
20 a m p l e b u f f e r s o l u t i o n w i t h 2-ME (2-mer
c a p t o e t h a n o l) (2 x) f o r S D S P A G E) を加え、2
5℃で 10 分間攪拌した。こうして得られたサンプル液を市販の SDS ゲル (B i
o R a d r e a d y G e l J, 15% SDS, c a t . N O = 1 6 1 - J 3 4
1) で分離し、その SDS ゲルを解析した。

25 結果、1 回目の樹脂処理をステアリン酸固定化樹脂で行った場合に比べて F K 5
0 6 結合樹脂で行った場合は、F K 5 0 6 結合樹脂上に特異的に結合すると考えら
れている F K B P 1 2 のバンドが明らかに減少しており拮抗が観察された。

なお、この結果は、下記で述べる通常の実験（従来法）の結果と酷似する内容であった。

（１－３）結合実験（従来法）

製造例３で合成したFK506を結合したアフィニティー樹脂を用いて従来の方法による結合実験を行った。なお、lysateは実施例２で調製したものと
5 同様のものを分割して使用した。

製造例３で合成したFK506を結合したアフィニティー樹脂（10 μ l、FK506量は約0.24 μ mol）を２つ用意し、片方にはlysate（1ml）と混合し、10 μ lのDMSOを加え（下記の実験との条件を同一にするため）

10 4℃で約１時間、静かに振とうした。また、もう片方に使用するlysateは樹脂との混合前にFK506（2.83mg）を100 μ lのDMSOで溶解した溶液を10 μ l（0.35 μ mol、樹脂上のリガンドの約1.5倍）予め加え１時間静かに撹拌したものを使用した。なお、事前の調査により、この量のDMSOおよびFK506添加は先に示したようなタンパク質の変性および凝集は見られない
15 ことが確認されている。各混合物を３時間ほど静かに撹拌した後に、遠心分離操作を行い、上澄み液を除去した。得られたFK506結合樹脂を混合液Aにて５回程度丁寧に洗浄し、樹脂上に結合するタンパク質以外を出来る限り除いた。

こうして得られた各FK506結合樹脂に25 μ lのSDS用loading buffer（nakalai cat. NO=30566-22、電気泳動用sample buffer solution with 2-ME（2-mercaptoethanol）（2x） for SDS PAGE）を加え、2
20 5℃で10分間撹拌した。こうして得られたサンプル液を市販のSDSゲル（BioRad readyGel J, 15%SDS, cat. NO=161-J341）で分離し、そのSDSゲルを解析した。

25 結果、樹脂上に特異的に結合すると考えられているFKBP12のバンドが予め拮抗剤のFK506を添加した場合には消失し、拮抗が観察された。

（１－４）結合実験（本願発明）

なお、上記「(1-2) 結合実験」と同じ結果は下記のような手順においても得ることが出来る。

製造例3で合成したFK506を結合したアフィニティー樹脂を用いて以下の手順でlysateとの結合実験を行った。なお、lysateは混合液Aで1/2に希釈して使用した。

樹脂(10 μ l)とlysate(1ml)を4℃で約1時間、静かに振とうした。その後、遠心分離操作を行い、夫々の上澄みを注意深く採集した。この時、分離したFK506結合樹脂を1回目の結合実験樹脂として4℃にて静かに保存しておく。そして、各上澄み液を再びフレッシュなFK506結合樹脂(10 μ l)と混合した。3時間ほど静かに攪拌した後に、遠心分離操作を行い、上澄み液を除去した。こうして2回目の結合実験で得られたFK506結合樹脂と1回目で得られた樹脂とを混合液Aにて5回程度丁寧に洗浄し、樹脂上に結合するタンパク質以外を出来る限り除いた。こうして得られた各FK506結合樹脂に25 μ lのSDS用loading buffer(nakalai cat. NO=30566-22、電気泳動用sample buffer solution with 2-ME(2-mercaptoethanol)(2x) for SDS PAGE)を加え、25℃で10分間攪拌した。こうして得られたサンプル液を市販のSDSゲル(BioRad readyGel J, 15%SDS, cat. NO=161-J341)で分離し、そのSDSゲルを解析した。

結果、1回目の樹脂上には、上記「(1-2) 結合実験」におけるステアリン酸固定化樹脂処理の結果とほぼ同様な結果が、また2回目の樹脂からは上記「(1-2) 結合実験」におけるFK506結合樹脂処理とほぼ同様な結果を得ることが出来た。なお、この結果は、先の「(1-2) 結合実験(本願発明)」、「(1-3) 結合実験(従来法)」で述べた結果と酷似する内容であった。

また、(1-4)で述べた操作を計6回まで繰り返したときの結果を図3に示す。図3に示すように、リガンドとして用いたFK506に特異的に結合することが知られているFKBP12のバンドは1回目の操作後にのみ確認され2回目以降には

まったく確認されなかった。また、非特異的タンパク質と考えられているチューブリンやアクチン等の他のタンパク質の結合量は操作の繰り返し回数によらずほぼ一定であった。

産業上の利用可能性

- 5 アフィニティー樹脂を用いたターゲット探索において拮抗実験は観察されたバンドの特異性を確認するのに重要な役割を演じている。本願発明は、従来懸念されていた対象リガンドの溶解度の問題がなく、また添加する対象リガンドによるタンパク質の非特異的変性作用の問題が低減された拮抗実験の一手法を提供するものであり、アフィニティー樹脂研究の基盤技術となると考えられる。

10

本出願は、日本で出願された特願2003-354503を基礎としておりその内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

1. リガンドと結合し得る分子の、そのリガンドとの結合が特異的であるか否かを検定する方法であって、以下の工程を含む方法；

5 (1) 試料をリガンド固定化固相担体で処理し、処理液を得る一方で固相担体上に結合したタンパク質を抽出し、リガンド固定化固相担体抽出液 1 を得る工程、

 (2) 前工程で得られた処理液をリガンド固定化固相担体（前工程で用いたリガンド固定化固相担体と同種のリガンドを固定化してなる別の固相担体）で処理し、処理液を得る一方で固相担体上に結合したタンパク質を抽出し、リガンド固定化固相担体抽出液 2 を得る工程、

10 (3) リガンド固定化固相担体抽出液 1 に含まれるタンパク質とリガンド固定化固相担体抽出液 2 に含まれるタンパク質とを比較解析する工程、

 (4) 工程（3）で得られた解析結果をもとにリガンド固定化固相担体抽出液 1 で検出され、且つリガンド固定化固相担体抽出液 2 で検出されないかまたは検出されても、他のタンパク質に比較し、リガンド固定化固相担体抽出液 1 に対する減少が有意なタンパク質を同定し、当該タンパク質をリガンド特異的と判定する工程。

15 2. 工程（2）を 2 回以上繰り返すことを特徴とする、請求項 1 記載の方法。

 3. リガンドと結合し得る分子の、そのリガンドとの結合が特異的であるか否かを

検定する方法であって、以下の工程を含む方法；

20 (1) 試料を 2 分割し、その一方を不活性物質固定化固相担体で処理し、処理液を得る工程、

 (2) 前工程で得られた、不活性物質固定化固相担体で処理した後の処理液をリガンド固定化固相担体（後述する工程（3）および工程（4）で用いるリガンド固定化固相担体と同種のリガンドを固定化してなる別の固相担体）で処理し、処理液を得る一方で固相担体上に結合したタンパク質を抽出し、リガンド固定化固相担体抽出液 1 を得る工程、

25

(3) 工程 (1) で 2 分割した残りの一方の試料をリガンド固定化固相担体で処理し、処理液を得る工程、

(4) 前工程で得られた、リガンド固定化固相担体で処理した後の処理液をリガンド固定化固相担体 (前工程 (3) で用いたリガンド固定化固相担体と同種のリガンドを固定化してなる別の固相担体) で処理し、処理液を得る一方で固相担体上に結合したタンパク質を抽出し、リガンド固定化固相担体抽出液 2 を得る工程、

(5) リガンド固定化固相担体抽出液 1 に含まれるタンパク質とリガンド固定化固相担体抽出液 2 に含まれるタンパク質とを比較解析する工程、

(6) 工程 (5) で得られた解析結果をもとにリガンド固定化固相担体抽出液 1 で検出され、且つリガンド固定化固相担体抽出液 2 で検出されないかまたは検出されても、他のタンパク質に比較し、リガンド固定化固相担体抽出液 1 に対する減少が有意なタンパク質を同定し、当該タンパク質をリガンド特異的と判定する工程。

4. 不活性物質がステアリン酸である、請求項 3 記載の方法。

5. 不活性物質が、対象となる当該リガンドと構造的に類似し、且つ当該リガンドが有する生理活性は有さないものである、請求項 3 記載の方法。

6. 試料が生体試料である、請求項 1 または 3 記載の方法。

7. さらに、比較解析によって、試料中のタンパク質のリガンドへの結合定数を算出する工程を含む請求項 1 または 3 記載の方法。

図 1

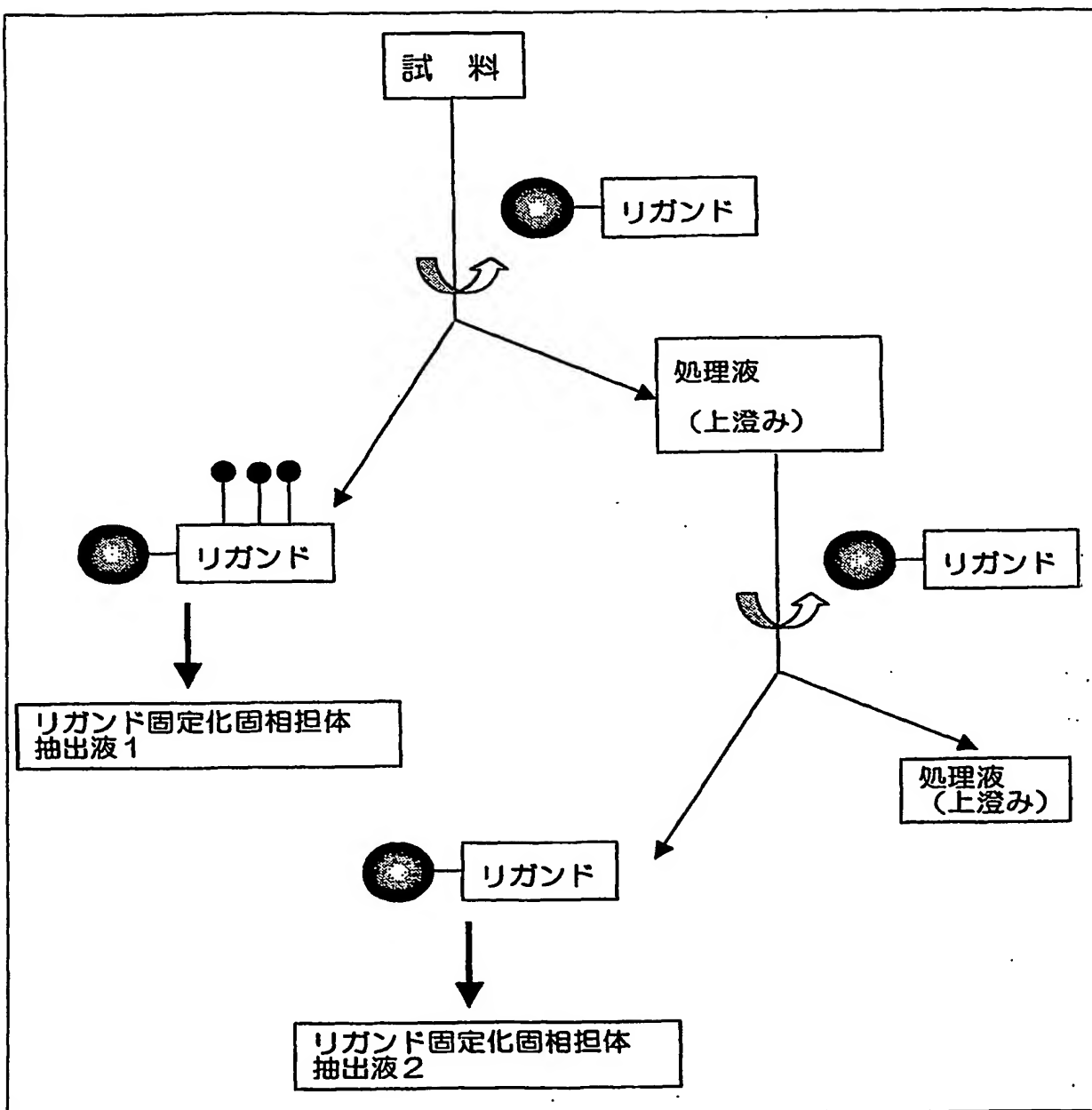


図2

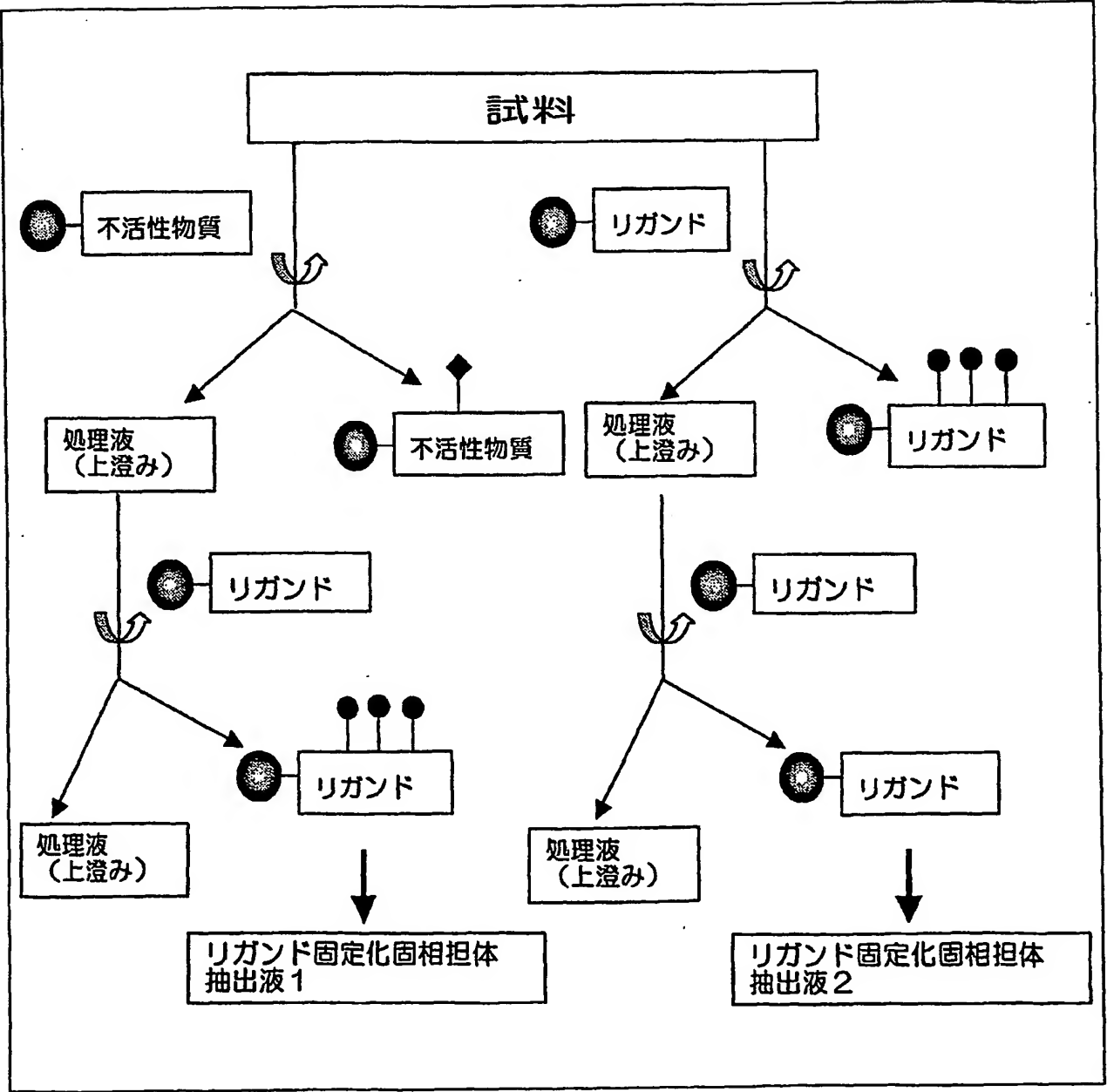
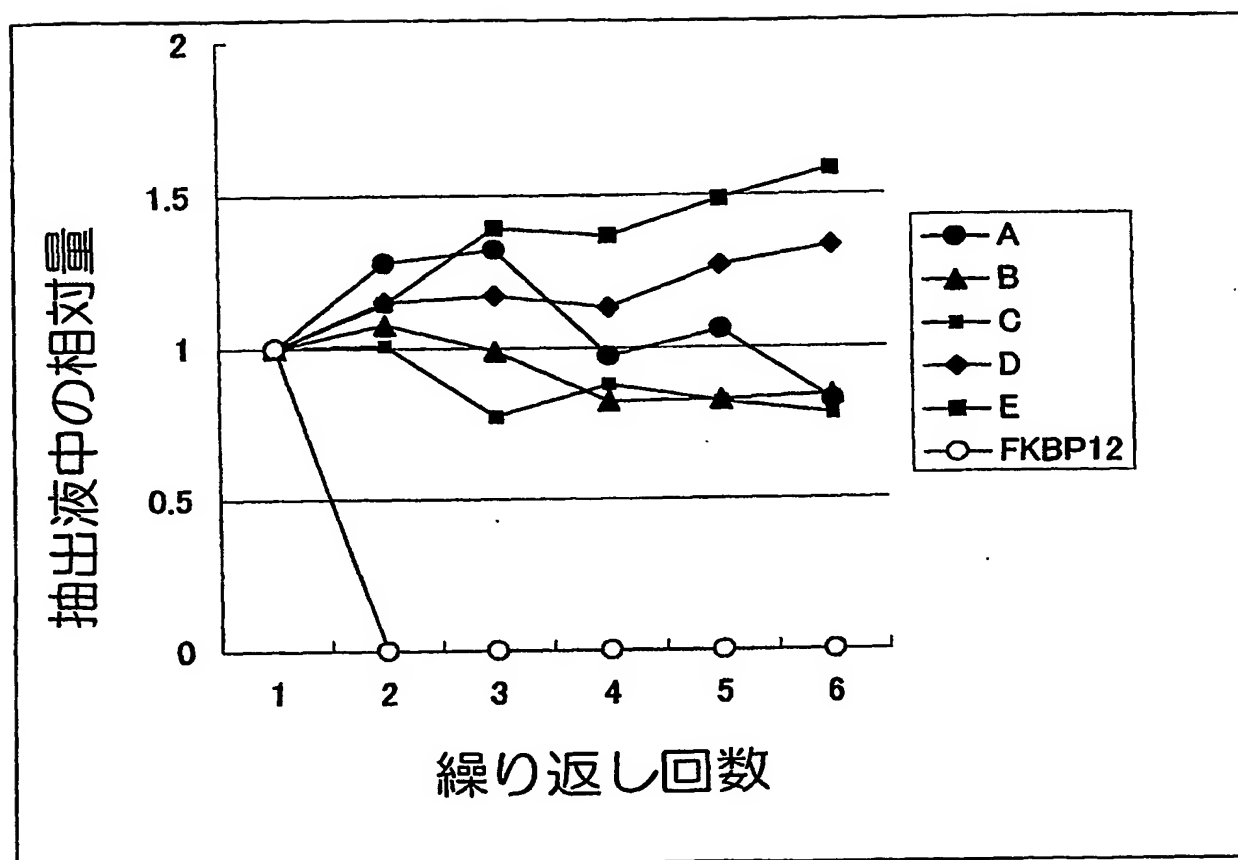


図 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015655

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ G01N33/543Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2000-074918 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 14 March, 2000 (14.03.00), Full text (Family: none)	1-7
A	JP 10-221341 A (Mitsui Chemicals, Inc.), 21 August, 1998 (21.08.98), (Family: none)	1-7
A	JP 60-501674 A (Ekins Roger Philip), 03 October, 1985 (03.10.85), & EP 0149631 A & US 4745072 A & WO 85/00226 A & DE 3475351 A	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
08 November, 2004 (08.11.04)Date of mailing of the international search report
22 November, 2004 (22.11.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015655

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 9-504859 A (PHARMACIA BIOSENSOR AB.), 13 May, 1997 (13.05.97), & DE 69426155 A & EP 0700519 A & US 5753518 A & WO 94/28416 A	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/543

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/543

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2004年
日本国登録実用新案公報	1994-2004年
日本国実用新案登録公報	1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2000-074918 A(松下電器産業株式会社) 2000.03.14 (ファミリーなし)	1-7
A	JP 10-221341 A(三井化学株式会社) 1998.08.21 (ファミリーなし)	1-7
A	JP 60-501674 A(イーキンズ, ロジャー フィリップ) 1985.10.03 & EP 0149631 A & US 4745072 A & WO 85/00226 A & DE 3475351 A	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.11.2004

国際調査報告の発送日

22.11.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加々美 一恵

2J

9408

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 9-504859 A(ファーマシア・バイオセンサー・アー・ペー) 1997.05.13 & DE 69426155 A & EP 0700519 A & US 5753518 A & WO 94/28416 A	1-7